

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01.53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Christian, Norbert, Marie SCHMIT SCHMIT - CHRETIEN - SCHIHIN 8, place du Ponceau 95000 CERGY France
Vos références pour ce dossier: 11302 FR	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
	UTILISATION DE GENES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES POUR MODIFIER UN PHENOTYPE RELATIF A UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN N° de téléphone	INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147 rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 France France LLC 180 070 039 01 42 75 90 00
5A MANDATAIRE	
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	SCHMIT Christian, Norbert, Marie CPI: 92 1225, Pas de pouvoir SCHMIT - CHRETIEN - SCHIHIN 8, place du Ponceau 95000 CERGY 01 30 73 84 14 01 30 73 84 49 info@schmit-chretien-schihin.com

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet		textebrevet.pdf	26	D 22, R 3, AB 1	
Dessins		dessins.pdf	2	page 2, figures 4	
Séquences		other1.pdf			
7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		2769			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Etablissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	15.00	225.00
Total à acquitter		EURO			545.00

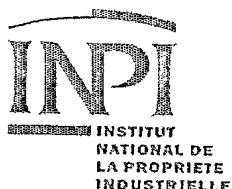
La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Cabinet Christian Schmit et associés, C. Schmit
Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	3 février 2004	
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0450199	Dépôt sur support CD:
Vos références pour ce dossier	11302 FR	

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

UTILISATION DE GENES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES POUR MODIFIER UN PHENOTYPE RELATIF A UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE

DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	ValidLog.PDF	indication-bio-deposit.xml
FR-office-specific-info.xml	other1.pdf	fee-sheet.xml
dessins.pdf	Comment.PDF	textebrevet.pdf
Requetefr.PDF	application-body.xml	request.xml

EFFECTUE PAR

Effectué par:	C. Schmit
Date et heure de réception électronique:	3 février 2004 17:17:49
Empreinte officielle du dépôt	DA:7E:98:FA:49:20:C8:5C:C4:CC:E9:AD:24:F3:0B:82:06:76:22:A7

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersburg
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

Utilisation de gènes codant des canaux potassiques pour modifier un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage d'une plante

5 *Domaine technique*

La présente invention se rapporte à une amélioration des qualités agronomiques d'une plante, en vue de l'obtention de caractéristiques améliorées pour l'industrie, tout particulièrement pour les industries agro-
10 alimentaires, par exemple, la production de baies de raisins de différentes tailles. Plus généralement, la présente invention vise à modifier une taille des organes de stockage tels que les fruits.

15 *Etat de la technique*

Une plante cultivée présente généralement une tige et au moins un organe de stockage. Par tige on entend une partie axiale de la plante qui s'élève au dessus du sol, croît en sens inverse des racines et porte les feuilles et l'organe de stockage. On entend par organe de stockage, tout
20 organe susceptible d'être consommé par un être vivant, comme par exemple une graine, un fruit charnu ou oléagineux, mais aussi des légumes ou des tubercules comme la pomme de terre. L'organe de stockage est relié temporairement à au moins une des extrémités de la tige. Ainsi, la sève élaborée transite depuis la tige vers les organes de stockage.

25 Il est connu des espèces de plantes qui naturellement forment des organes de stockage présentant des phénotypes "petite taille" ou "grande taille" par rapport à une taille d'un organe de stockage de référence de cette même espèce. On entend par taille de référence d'un organe de stockage, une taille moyenne d'organes de stockage calculée à partir d'un échantillon
30 donné d'organes de stockage "sauvage" d'une même espèce.

Pour des raisons de commodité de production, transformation ou consommation, il peut être intéressant de modifier la taille des organes de stockage pour augmenter ou diminuer leur volume. Par exemple, en augmentant le volume des organes de stockage pour obtenir des organes de
35 stockage présentant un phénotype grande taille, on peut éviter d'augmenter le nombre de tiges de plantes à cultiver dans un champs. Ou inversement,

en diminuant le volume d'organes de stockage pour obtenir des organes de stockage présentant un phénotype petite taille, on peut par exemple répondre à une attente des consommateurs souhaitant ingérer de tels organes de stockage miniaturisés en peu de bouchées. Notamment, il est
5 connu que l'on peut d'obtenir des tomates de gros volumes qui sont particulièrement adaptées pour une préparation culinaire de tomates farcies. Ou bien, il est également connu d'obtenir des tomates de faibles tailles ou plus communément appelées "tomates cerises" que l'on a l'habitude de consommer en apéritif.

Problème technique

Actuellement, il est difficile de jouer sur la taille des organes de stockage. Par exemple, pour augmenter la taille des organes de stockage en
15 vue d'obtenir un meilleur rendement, on utilise généralement des engrais. De tels engrais sont choisis de manière à répondre aux besoins nutritionnels de la plante et à compenser les éventuelles carences nutritives du sol. Par exemple, les engrais fournissent des éléments indispensables à la fabrication de protéines et constituants cellulaires pour la plante.

20 Cependant, l'engrais peut être un produit néfaste pour l'environnement. L'ajout d'engrais entraîne notamment des pollutions du sol et des nappes phréatiques. L'évacuation des nitrates dans le sol est difficile. De plus, il est nécessaire de rajouter régulièrement de l'engrais du fait que les éléments nutritifs contenus dans cet engrais s'épuisent au cours de la
25 consommation par la plante.

En outre, pour diminuer la taille des organes de stockage, des générations de croisement de plantes peuvent être nécessaires pour sélectionner la taille que l'on souhaite. Enfin, il peut arriver que le phénotype "petite taille" ou "grande taille" ne soit pas stable d'une génération à une
30 autre.

Un des buts de l'invention est de pouvoir justement jouer sur la taille des organes de stockage, selon les besoins de l'utilisateur sans les inconvénients cités ci-dessus.

Solutions apportées par l'invention

Les inventeurs ont découvert que durant le développement de la baie de la vigne *Vitis vinifera*, le potassium était fortement et constamment accumulé dans l'exocarpe et dans les cellules du tissu vasculaire liant le
5 pédicelle à la baie. A l'inverse, les inventeurs ont observé que durant ce même développement, la concentration de potassium dans les cellules de la baie tend à diminuer.

De telles observations ont conduit les inventeurs à s'intéresser plus spécifiquement à identifier un système de transport transmembranaire d'ions
10 potassium chez la plante *Vitis Vinifera*. A partir de gènes déjà identifiés chez *Arabidopsis* codant pour des canaux potassiques sortant de type Shaker, les inventeurs ont pu identifier un gène VvSOR chez *Vitis Vinifera* qui code pour un nouveau canal potassique sortant similaire à un canal potassique sortant déjà isolé chez *Arabiposis*.

15 Au cours des diverses expériences, les inventeurs ont découvert qu'en surexprimant ce gène dans la vigne, la taille des baies était augmentée. Ainsi, le gène VvSOR code pour un canal potassique sortant rectifiant impliqué dans la croissance des baies de raisin.

Ainsi, par l'intermédiaire de ce gène VvSOR, un autre but de
20 l'invention est de détecter dans un grand nombre d'espèces de plantes, un gène similaire codant pour un canal potassique sortant. Ce gène similaire pourra alors être utilisé pour moduler la croissance des organes de stockage de chacune des espèces pour lesquelles on aura pu isoler le gène d'intérêt.

25 *Sommaire de l'invention*

L'invention a donc pour objet premier un procédé pour l'obtention d'une plante transformée en fonction d'un phénotype relatif à une taille d'un organe de stockage de la plante, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape
suivante :

30 - modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou dans les tissus qui alimentent l'organe de stockage l'expression d'un gène codant pour un canal potassique.

L'invention a également pour objet un marqueur d'un gène intervenant dans un phénotype relatif à une taille d'un organe de stockage caractérisé en
35 ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant une séquence

polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la séquence nucléique SEQ ID N°.1 ou de tout ou partie d'une séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°.1, ou d'une séquence nucléotidique SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.

5 L'invention a aussi pour objet une amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de l'une ou l'autre séquence nucléotidique SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.

10 L'invention a trait également à un procédé de sélection d'une plante en fonction d'un phénotype relatif à une taille des organes de stockages de la plante, caractérisé en ce qu'on mesure l'expression d'un gène codant pour un canal potassique dans les cellules des organes de stockage ou dans les tissus alimentant les organes de stockage.

15 L'invention concerne une cellule d'une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.

20 L'invention concerne également une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

25 L'invention a aussi pour objet une utilisation d'un gène codant pour un canal potassique pour modifier dans une plante un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage.

L'invention a aussi pour objet un anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant un canal potassique.

30 L'invention a pour objet un procédé de détection d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mettre en contact l'échantillon avec l'anticorps précédemment décrit,
et

35 - détecter un complexe antigène/anticorps formé.

Et enfin, l'invention a pour objet un kit de détection de tout ou partie d'une séquence polypeptidique issue d'un gène codant un canal potassique, caractérisé en ce qu'il comprend l'anticorps précédemment décrit.

5 *Description détaillée*

10 L'un des buts de l'invention est de permettre l'obtention de manière sûre d'au moins une plante dont le phénotype relatif à la taille des organes de stockage est modifié. Pour cela, l'invention a pour objet un procédé dont l'une des étapes consiste à modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou les tissus qui l'alimentent une expression d'un gène codant pour un canal potassique.

15 Comme précédemment mentionné, on entend par plante un organisme végétal comportant une tige et au moins un organe de stockage, la tige étant destinée à supporter temporairement cet organe de stockage. Par tige on entend une partie axiale de la plante qui s'élève au dessus du sol, croît en sens inverse des racines et porte les feuilles et les organes de stockage. On entend par organe de stockage, tout organe susceptible d'être consommé par un être vivant, comme par exemple un fruit charnu, un fruit oléagineux, des graines mais aussi des légumes ou des tubercules comme la pomme de terre. L'organe de stockage est relié temporairement à au moins une des extrémités de la tige. Ainsi, la sève élaborée transite depuis la tige vers les organes de stockage.

25 On entend par "gène" une séquence ordonnée de nucléotides qui occupe une position précise sur un chromosome déterminé et qui constitue une information génétique dont la transmission est héréditaire. Les gènes correspondent à une portion d'une molécule d'ADN. Ils possèdent la capacité de se répliquer. Les gènes représentent les unités physiques et fonctionnelles élémentaires de l'hérédité. L'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génome.

30 Les termes "acides nucléiques", "polynucléotides", "oligonucléotides" ou encore "séquences nucléotidiques" englobent les séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

Le terme "nucléotide" désigne à la fois des nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle qu'un analogue d'une purine, un analogue d'une pyrimidine, ou un sucre analogue.

5 Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant "complémentaire" d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

10 La modification de l'expression d'un gène dans la cellule végétale peut s'effectuer par transgénése végétale. La transgénése est une transformation de la cellule végétale qui peut être réalisée par les techniques connues de l'homme du métier. Plus particulièrement, on entend par transgénése un ensemble d'opérations permettant d'obtenir des organismes transgéniques, c'est-à-dire dont un patrimoine génétique a été modifié. On entend par
15 patrimoine génétique l'ensemble des séquences nucléotidiques contenu dans au moins une cellule d'un organisme vivant. Le patrimoine peut être modifié par l'introduction dans la cellule d'une cassette d'expression obtenue par génie génétique et comportant un gène exogène ou gène étranger. Par
20 cassette d'expression on entend une séquence nucléotidique codant au moins pour des signaux de début et de fin de transcription. Par gène exogène on entend un gène issu d'une manipulation génétique visant ou non à modifier un gène en particulier dans la cellule. Dans l'invention, ce gène particulier est la séquence SEQ ID N°1 ou une séquence codant une
25 séquence polypeptidique comportant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N° 1. Introduit dans cette cassette d'expression, le gène exogène sera transcrit en ARN messager dans la cellule, grâce aux signaux propres de la cassette.

30 L'introduction du gène étranger dans la cellule peut être réalisée directement par microinjection directe de ce gène étranger dans des embryoides de plante, par infiltration sous vide, par électroporation, par précipitation directe au moyen de polyéthylène glycol (PEG) ou par bombardement par canon de particules recouvertes de l'ADN plasmidique d'intérêt.

On peut également transférer l'ADN étranger en infectant la plante par une souche bactérienne, notamment d'*Agrobacterium*.

De nombreux procédés de l'état de la technique peuvent être aisément mis en œuvre par l'homme du métier afin d'obtenir des plantes ou
5 des cellules transformées par un gène codant un canal potassique, selon l'invention.

Ces techniques de transferts de l'ADN visent soit à activer une expression d'un gène dans la cellule (ou gène cellulaire) ou à inactiver cette même expression. L'activation du gène cellulaire peut s'effectuer soit en
10 insérant plusieurs copies du même gène (ou gène étranger) dans un génome cellulaire, ou en plaçant la séquence codante du transgène sous le contrôle d'un promoteur dit fort (c'est-à-dire conduisant à un fort niveau d'expression), ou bien en insérant une seule copie du gène et un facteur de transcription puissant du gène. L'inactivation du gène cellulaire peut par exemple se faire
15 en insérant un gène étranger dont l'ARNm est complémentaire de l'ARNm du gène d'intérêt. Ainsi, les deux ARNm d'origine cellulaire et étranger s'hybrident et aucune protéine ne peut être produite.

Selon un exemple particulier de l'invention, le procédé d'obtention de plantes dont le phénotype relatif à la taille des organes de stockage est
20 modifié peut être réalisé en transformant au moins une cellule de la plante d'intérêt avec un gène codant pour un canal potassique. Puis, les cellules transformées sont sélectionnées. Puis, une plante transformée est régénérée à partir des cellules transformées. La cellule à transformer peut être choisie parmi des cellules d'une plante pouvant reproduire un organisme entier.

25 Selon un exemple particulier de l'invention, le gène dont l'expression est modifiée code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.

30 On entend par séquence polypeptidique un enchaînement d'acides aminés.

Le pourcentage de similarité entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des substitutions par rapport à la séquence de référence de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

5 Le pourcentage de similarité se calcule entre deux séquences polypeptidiques. Ce pourcentage de similarité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles deux résidus d'acide aminé se correspondent dans un alignement tout en appartenant à une même famille physico-chimique d'acides aminés, puis en divisant ce nombre par le nombre total de
10 positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent pour obtenir le pourcentage de similarité.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière préférée, le pourcentage de similarité de séquences est
15 déterminé à l'aide du logiciel BLAST (version BLAST 2.06 de Septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

La séquence SEQ ID N°1 correspond à un ADNc codant un nouveau canal potassique sortant de *Vitis Vinifera* et qui a été détecté par l'intermédiaire de deux gènes codant pour des canaux potassiques similaires
20 chez *Arabidopsis thaliana*.

En dessous de 40% de similarité de séquence polypeptidique, la séquence polypeptidique identifiée chez une espèce de plante donnée risque de ne pas correspondre à un gène codant un canal potassique similaire au canal potassique codé par le gène SEQ ID N°1. Une telle séquence prélevée
25 peut ne pas correspondre à un gène susceptible d'intervenir dans la modification du phénotype relatif à la taille d'organes de stockage. Alors qu'on peut obtenir dans chacune des espèces de plantes donnée un gène codant une séquence polypeptidique comprenant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite du gène de la SEQ ID N°1 codant
30 un canal potassique chez *Vitis Vinifera*. Par exemple, on pourra identifier une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique comportant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1 chez la pomme de terre ou chez le riz, et utiliser un tel gène pour modifier le phénotype relatif à la taille d'organes de stockage de
35 ces deux plantes ou d'autres espèces de plantes.

Selon un procédé de réalisation préféré de l'invention, on choisit de modifier l'expression du gène du canal potassique de manière à augmenter la taille de l'organe de stockage. Mais, on pourrait également choisir de diminuer la taille des organes de stockage. Pour augmenter la taille d'un organe de stockage selon l'invention, on choisit de surexprimer le gène codant le canal potassique précédemment décrit. En effet, les inventeurs ont découvert qu'en surexprimant le gène VvSOR dans la cellule de baie de raisins de *Vitis vinifera* tout en transférant au moins une copie supplémentaire du gène d'intérêt dans la cellule par transgénése, la taille de la baie était 1,7 fois plus importante que la taille de référence d'une baie de raisins "sauvage". On entend par taille de référence d'une baie de raisin "sauvage", une taille moyenne calculée à partir de la taille de l'ensemble des baies de raisins contenues dans un échantillon représentatif prélevé sur un cultivar de *Vitis Vinifera* "sauvage" correspondant, n'ayant subi aucune transformation génétique, selon l'invention.

Pour la présente invention, les inventeurs ont augmenté l'expression du gène d'intérêt impliqué dans la croissance des organes de stockage. Pour ce faire, ils ont cloné un ADN complémentaire VvSOR (ou ADNc VvSOR) ou SEQ ID N°1 issu de la vigne *Vitis vinifera* dans un vecteur CAMV 35S pour obtenir un vecteur recombinant. Des cellules embryogéniques de la vigne *Vitis* ont été ensuite transformées avec ce vecteur recombinant pour insérer dans le génome de ces cellules au moins une copie supplémentaire du gène. La cellule à transformer peut être choisie parmi les cellules d'une plante pouvant reproduire un organisme entier. Cette technique a été plus particulièrement décrite dans le document Torregrosa, L. (1998) *Vitis* 37, 91-92.

On utilise alors le gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la séquence polypeptidique déduite de la séquence du gène SEQ ID N°1 pour augmenter l'expression de la protéine correspondante dans les cellules de chaque espèce de plante dont on veut modifier la taille de l'organe de stockage.

Selon l'invention, on obtient alors une cellule transformée par le procédé d'obtention ci-dessus décrit.

Selon l'invention également, on obtient une plante transformée par le procédé d'obtention et par la cellule transformée ci-dessus décrit.

L'invention prévoit également un marqueur d'un gène intervenant dans un phénotype relatif à une taille d'un organe de stockage. Le marqueur comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la séquence nucléique SEQ ID N°1 ou tout ou partie d'une séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°1, ou d'une séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Ce pourcentage de similarité prend en compte les différences existant d'une espèce de plante à une autre tout en assurant que le gène code pour un canal potassique impliqué dans le phénotype taille d'organe de stockage ou ayant un comportement similaire au canal potassique issu de l'expression du gène SEQ ID N°1.

Ce marqueur peut être utilisé pour détecter des plantes dans lesquelles est exprimé un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléique SEQ ID N°1. Ces plantes pour lesquelles on a pu identifier le gène similaire au gène de la SEQ ID N°1 peuvent alors être modifiées selon l'invention par l'intermédiaire de ce gène détecté.

Ce marqueur peut être détecté par hybridation moléculaire entre la séquence nucléotidique d'un marqueur d'une plante donnée et tout ou partie de la séquence SEQ ID 1, de la séquence complémentaire de SEQ ID N°1 ou de la séquence SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

La séquence nucléotidique du marqueur peut être sous une forme d'un d'ADNc, d'un brin d'ADN non codant ou d'un ARNm. La séquence nucléotidique du marqueur peut être sous toute forme susceptible d'être détectée par hybridation moléculaire avec tout ou partie de la séquence SEQ ID N°1, de la séquence complémentaire SEQ ID N°1 ou de la SEQ ID N°2 ou de la séquence SEQ ID N°3.

Les séquences nucléotidiques SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3 forment respectivement une amorce avant et une amorce arrière de la SEQ ID N°1. Ces amorces permettent de détecter une présence du gène SEQ ID N°1 via une hybridation de l'ADNc, de l'ADN non codant, ou de l'ARNm issu du gène SEQ ID N°1. Ces amorces correspondent à des séquences nucléotidiques flanquant le gène de la séquence SEQ ID N°1.

L'invention concerne également une amorce nucléotidique qui comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie des séquences nucléotidiques SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Ces séquences SEQ ID N°2 et SEQ ID N° 3 correspondent respectivement à une séquence flanquante avant et à une séquence flanquante arrière de la SEQ ID N°1. Ces amorces peuvent servir pour réaliser une RNA-PCR, technique bien connue de l'homme du métier. Cette technique permet d'amplifier le gène d'intérêt pour ensuite l'utiliser afin de modifier l'expression d'un gène codant un canal potassique d'une plante selon l'invention.

Pour sélectionner des plantes ou des cellules de plantes relativement à un phénotype "taille" des organes de stockages desdites plantes, l'invention prévoit que l'on mesure l'expression d'un gène codant pour un canal potassique dans les cellules des organes de stockage ou les tissus qui alimentent cet organe.

L'invention prévoit que le gène dont on mesure l'expression code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la séquence polypeptidique déduite du gène défini par la séquence SEQ ID N°1.

Pour mesurer l'expression du gène d'intérêt, on peut réaliser selon l'invention soit une mesure d'une quantité d'ARNm issu d'une transcription du gène codant pour le canal potassique, soit une mesure d'une quantité de protéines résultant de l'expression de ce gène. La mesure de ces quantités peut être réalisée par des techniques de biologie moléculaire bien connues de l'homme du métier. Par exemple la mesure de ces quantités peut être réalisée par une technique d'hybridation moléculaire (Northern Blot), une technique de reverse-PCR quantitative ou par une technique de Western Blot.

Les inventeurs ont découvert que l'expression du gène VvSOR correspondant à la SEQ ID N°1 est particulièrement observable dans les cellules des parties aériennes de la plante *Vitis vinifera* et dans les organes de stockage de cette même plante.

Les inventeurs ont découvert que le gène VvSOR code une protéine comportant 796 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 91,2

kDa. La protéine comporte une structure typique des canaux Shaker des plantes (voir figure 1). Cette protéine comporte une région N-terminale, un cœur hydrophobe composé de 6 segments transmembranaires (dénommés S1 à S6) et un pore formant un domaine (P) entre S5 et S6, une longue
5 région C-terminale contenant un site supposé être un site de liaison de nucléotide cyclique, suivi par un domaine ankyrine consistant en 6 motifs répétés, suivi d'un domaine K_{HA} (Zimmermann, S. et Sentenac, H. (1999) Current Opinion in Plant Biology 2, 477-482), riche en acides aminés hydrophobe et acides. L'ensemble des régions C et N terminales des canaux
10 de plante de type Shaker est supposé être de localisation cytoplasmique.

Le développement des baies de raisins est caractérisé en une première phase de croissance, une phase intermédiaire de stagnation suivie d'une transition appelée véraison puis d'une deuxième phase de croissance. Notamment, les inventeurs ont découvert que la quantité d'ARNm issu de
15 l'expression du gène SEQ IDN°1 était particulièrement importante au cours du développement de la baie et que la quantité de protéines était particulièrement importante au moment du développement et après le développement de la baie.

Les mesures de l'expression du gène d'intérêt peuvent donc
20 s'effectuer préférentiellement à des moments particuliers de développement de la plante. Dans un exemple particulier de réalisation de l'invention, on préféra choisir le moment du développement de l'organe de stockage pour prélever des cellules et mesurer leur taux d'ARNm ou pour mesurer le taux de protéines exprimé par le gène d'intérêt dans une cellule transformée.

25 En réalisant le procédé de sélection sur des cellules d'un organe de stockage à un moment du développement, il est avantageusement possible d'identifier les plantes ayant des organes de stockage de grosse taille du fait spécifiquement de la surexpression du gène et non du fait d'un ensoleillement ou d'une alimentation particulièrement propice. Par ce fait, les
30 plantes ainsi identifiées ont de grandes chances de produire de manière stable et reproductible de nouvelles générations de plantes ayant également cette caractéristique génétique.

Ainsi, on évite de sélectionner des plantes non transformées qui posséderaient par exemple un facteur de transcription puissant devant le
35 gène SOR présent dans les plantes de références.

Il est également possible de sélectionner les plantes transformées par l'intermédiaire d'un antibiotique. En effet, au cours de la transformation de cellules d'organes de stockage, on peut prévoir que le vecteur recombinant comporte un gène de résistance à un antibiotique en plus du gène d'intérêt.

5 Par ailleurs cette méthode peut être une méthode de vérification et être utilisée pour vérifier que les plantes ont bien été transformées.

Préalablement à l'étape de mesure de l'expression du gène, on peut sélectionner des plantes dont les organes de stockage ont une taille au moins supérieure de 25% en masse par rapport à une taille de référence d'organes de stockage.

10 On entend par taille de référence d'organes de stockage, une taille moyenne calculée à partir d'une mesure de l'ensemble d'organes de stockage issu d'un échantillon d'organes de stockage sauvage, c'est à dire qui n'ont pas été transformée et qui sont représentatifs de l'espèce et de la variété, lignée ou cultivar considérés. On obtient ainsi une taille de référence pour chaque variété, lignée ou cultivar d'une espèce de plante considérée.

15 Par exemple, la taille d'un organe de stockage peut être quantifiée en mesurant le poids de 100 organes de stockage pour une espèce sauvage donnée. On obtient alors un poids de référence d'organes de stockage pour une plante donnée non transformée. Parallèlement, on mesure le poids de 20 100 autres organes de stockage d'une plante qui a été modifiée selon l'invention. Puis on compare ces deux poids pour en déduire une éventuelle transformation de la plante. Dans un exemple, les inventeurs ont découverts que le poids d'un organe de stockage issu d'une plante transformée selon 25 l'invention était 1,7 fois plus important que le poids d'un organe de stockage issu d'une plante non transformées.

L'invention concerne également une utilisation d'un gène codant pour un canal potassique pour modifier un phénotype relatif à une taille des organes de stockage d'une plante. Le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1. Ce gène est utilisé dans l'invention en modifiant son expression. Notamment, dans un exemple préféré de l'invention, on a choisi de surexprimer le gène dans des cellules de l'organe de stockage pour augmenter la taille des organes de 30 stockage. Mais on pourrait choisir également d'inhiber son expression pour 35

diminuer la taille des organes de stockage. Ce gène permet d'identifier les plantes comportant un gène dont l'expression permet d'obtenir un canal potassique de propriétés physiologiques similaires au canal potassique de VvSOR.

5 L'invention concerne également un anticorps dirigé contre tout ou partie d'une séquence polypeptidique issue de l'expression d'un gène, laquelle séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

10 On entend par anticorps au sens de la présente invention des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple les fragments F(ab)'2, F(ab)) ou encore des fragments comprenant un domaine de l'anticorps initial reconnaissant le polypeptide ou le fragment de polypeptide cible selon l'invention.

15 L'anticorps peut être obtenu par la technique des hybridomes bien connu de l'homme du métier. Cette technique des hybridomes consisterait dans ce cas à réaliser une fusion entre des cellules productrices d'anticorps dirigés contre une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la SEQ ID N°1 avec une cellule myélomateuse.

20 Un anticorps selon l'invention pourra être facilement détectable et pourra donc comprendre en outre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

25 Cet anticorps peut servir pour la mise en œuvre de la détection dans un échantillon d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique. Dans ce but, cet anticorps est placé dans l'échantillon et l'expression du gène dont on cherche à modifier l'expression est détectée par la présence d'un complexe antigène
30 anticorps.

Le gène pour lequel on cherche à détecter la présence du polypeptide correspondant code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

L'invention est enfin relative à un kit de détection de tout ou partie du polypeptide précédemment décrit dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend

- un anticorps précédemment décrit, l'anticorps étant détectable par des techniques de marquage de l'anticorps bien connues de l'homme du métier.

Figures

- Figure 1 : Une représentation schématique d'un canal potassique codé par le gène VvSOR de *Vitis vinifera* ;

- Figure 2 : Gel d'une migration électrophorétique de produits d'amplification par RT-PCR quantitative de l'ARNm produit par le gène VvSOR dans des cellules ou tissus prélevés à différents endroits d'une plante transformée (PT) ou d'une plante non transformée (PNT) ;

- Figure 3 : Une représentation graphique de quantité d'ARNm produit par des baies de raisins de *Vitis vinifera* au cours de la croissance de telles baies , et

- Figure 4 : une première photographie représentative de grappes de raisins au stade véraison issues de plantes non transformée et une deuxième photographie représentative de grappes de raisins au stade véraison issues de plantes transformées.

Exemples

Exemple de mise en œuvre du procédé d'obtention de cellules transformées et vérification

Pour obtenir une plante transformée, on modifie une expression du gène VvSOR (ou SEQ ID N°1) qui consiste à réaliser une transgénèse. Pour réaliser cette transgénèse, on transforme une cellule embryogénique avec un vecteur recombinant qui comporte une copie supplémentaire du gène d'intérêt cellulaire. Puis on vérifie que la transgénèse a bien été réalisée en mesurant l'expression du gène cellulaire et du gène étranger.

- Matériels et méthodes

La plante ainsi que les techniques utilisées pour réaliser les analyses génomiques ont été décrites par Pratelli, R., et al., 2002, Plant Physiology 128, 564-577.

5 *Criblage d'une banque d'ADNc de Vitis Vinifera*

On réalise un criblage d'une banque d'ADNc de baies de *Vitis vinifera* pour identifier la SEQ ID N°1, avec deux sondes préparées à partir d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* (ADNc *AtSKOR* et ADNc *AtKCO1*), chacun de ces ADNc codant pour un canal sortant rectifiant de potassium de type Shaker.

10 Le criblage a été réalisé selon une technique bien connue de l'homme du métier (Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C. and Delrot, S. (1999) Plant Physiology 120, 1083-1093 ; Gaymard, F. et al. (1998) Cell 94, 647-655 ; Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B. (1997) The EMBO Journal 16, 2565-
15 2775 ; Church, G.W. and Gilbert, W. (1984) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 1991-1995).

Transformation de la baie

20 Pour transformer la vigne *Vitis Vinifera*, on réalise une transgénèse qui a pour but d'augmenter l'expression du gène obtenu après criblage de la banque d'ADNc de cellules de baies de *Vitis vinifera*. On prépare des cellules embryogéniques de *Vitis vinifera* en vue de les transformer avec l'ADNc (ou SEQ ID N°1) codant pour un canal potassique de *Vitis vinifera* et obtenu après criblage de la banque d'ADNc juste ci-dessus décrite.

25 Cette transformation vise spécifiquement à transférer au moins une copie supplémentaire de l'ADNc ou SEQ ID N°1 dans le cytoplasme de la cellule et à l'intégrer dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte. On prépare parallèlement un vecteur comme décrit par Torregrosa, L. (1998, Vitis 37 ,91-92) en vue d'obtenir un futur vecteur recombinant comportant la séquence
30 nucléotidique isolée par criblage de la banque.

Amplification de l'ADNc VvSOR

Pour amplifier l'ADNc, on réalise une RNA-PCR et une semi-quantitative RNA-PCR Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F.,
35 Romieu, C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. (2002) Plant Physiology 128,

564-577). Les amorces spécifiques pour VvSOR sont l'amorce SOR avant ou SEQ ID N°2 et l'amorce SOR arrière ou SEQ ID N°3. Cette RNA-PCR s'effectue à partir d'ARNm issus de cellules d'une plante transformée (PT) et à partir de cellules issues d'une plante non transformées (PNT). Les ARN ont été prélevés à différents endroits de la plante transformée (PT) et à différents endroits de la plante non transformée (PNT), figure 2. Notamment, pour chacune des plantes PT et PNT, on a prélevé des ARN à partir de cellules de queue du fruit (S), de cellules de racine (R), de cellules de la tige (St), de cellules de feuilles (L), de cellules de baies verte (GB), de cellule de baies au moment de la véraison (BV), et de cellules de baies mature (MB).

Quantifications

On isole les ARNm et les protéines des échantillons prélevés sur des plantes transformées et des plantes non transformées. Puis on quantifie par les techniques d'hybridation moléculaire (Northern Blot), Reverse-PCR quantitative et Western Blot la quantité d'ARNm et de protéines issues de l'expression du gène SEQ ID N°1.

Etude du rôle électrophysiologique du canal codé par le gène isolé après criblage de la banque d'ADNc de baies de raisins de Vitis vinifera dans un ovocyte de Xénope

L'ADNc qui a été isolé après criblage de la banque est cloné dans un vecteur, et un tel vecteur recombinant est ensuite injecté dans un ovocyte de Xénope selon une technique de "patch clamp", technique bien connue de l'homme du métier. Cette technique de "patch clamp" permet d'étudier les propriétés électrophysiologiques de canaux transmembranaires vis-à-vis de certains ions.

- Résultats

Résultat du criblage de la banque d'ADNc, figure 1

Un insert de 2,4 kbp a été détecté et séquencé. Cet insert a servi à isoler le gène complet de *Vitis Vinifera* qui code pour un nouveau canal potassique sortant similaire aux canaux potassiques d'*Arabidopsis*, de type

Shaker. Une longueur de cet ADNc complet est de 2,5 kbp. Cet ADNc complet est appelé *VvSOR* (*Vitis vinifera* Shaker-like Outward Rectifier).

Les inventeurs ont découverts que le gène *VvSOR* code une protéine comportant 796 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 91,2 kDa. La protéine comporte une structure typique des canaux Shaker des plantes (voir figure 1). Cette protéine comporte une région N-terminale, un cœur hydrophobe composé de 6 segments transmembranaires (dénommés S1 à S6) et un pore formant un domaine (P) entre S5 et S6, une longue région C-terminale contenant un site supposé être un site de liaison de nucléotides cycliques, suivi d'un domaine ankyrine consistant en 6 domaines répétés puis d'un domaine K_{HA} (Zimmermann, S. and Sentenac, H. (1999) *Current Opinion in Plant Biology* 2, 477-482.), riche en acides aminés hydrophobes et acides. L'ensemble des régions C et N terminales des canaux de plante de type Shaker est supposé être de localisation cytoplasmique.

Le gène *VvSOR* comporte 84% d'identité vis-à-vis du gène *AtSKOR* (Gaymard, F. et al. (1998) *Cell* 94, 647-655) et 79% vis-à-vis du gène *AtGORK* (Ache, P. et al. (2000) *FEBS Letters* 486, 93-98). La comparaison de la structure des gènes et de la position des introns de *VvSOR*, de *AtSKOR* et de *AtGORK* a montré que le gène de la Vigne *Vitis* était plus proche du gène *AtGORK*, en particulier parce que ces deux gènes possèdent des positions spécifiques d'introns que l'on ne retrouve pas dans le gène *AtSKOR* (Pilot, G., et al., 2003, *Journal of Molecular Evolution* 56, 418-434). Le gène *SOR* est donc l'orthologue du gène *GORK* dans la vigne *Vitis vinifera*.

Résultats de l'amplification, localisation de l'expression du gène VvSOR, figures 2 et 3

Les ARNm issus de l'expression du gène SEQ ID N°1 sont présents dans les cellules de la queue du fruit (S), dans les cellules de la tige (St), dans les cellules des feuilles (L), dans les cellules de baies verte (GB), dans les cellules de baie au moment de la véraison (BV), et dans les cellules de baies mature (MB). Mais les ARN issus de l'expression du gène SEQ ID N°1 ne sont pas présentes dans les racines (R), figure 2. Les inventeurs ont donc pu montrer que l'expression du gène était remarquable dans les parties

ariennes de la plante, et notamment dans les feuilles, les jeunes poutres, et les baies mais pas dans les racines.

Les ARNm issus de la plante transformée sont présents en quantité relative plus grande que les ARNm issus de la plante non transformée (figure 2).

Les inventeurs ont également estimé la quantité d'ARNm produit au cours de la croissance des baies de raisins de la plante, figure 3. La figure 3 représente une quantité d'ARNm produit au cours du développement de la baie de raisins en fonction du temps. En particulier, le développement des baies de raisins est caractérisé par une première étape de croissance C1, une étape de stagnation suivie d'une transition appelée véraison et d'une deuxième étape de croissance C2. Les inventeurs ont observé que la quantité d'ARNm est à son maximum au moment de la véraison, indiquant que la détection des plantes transformées doit s'effectuer préférentiellement au moment de la véraison.

Résultats de la transformation

La figure 4 présente une première photographie de grappes de baies de raisins issues de plantes non transformées et une deuxième photographie de baies de raisins de plantes transformées. Les inventeurs ont mesuré le poids de nombreux échantillons représentatifs constitués de 100 baies issues de plantes PT et de 100 baies issues de plante PNT. Les inventeurs ont observé à l'œil nu que la taille des baies issues de plantes transformées était plus élevée que la taille des baies issues de plantes non transformées. Les inventeurs ont observé que la taille des baies (estimée par le poids moyen de 100 baies) issues de plantes transformées est 1,7 fois plus importante que la taille des baies de raisins issues de plantes non transformées.

De plus après migration électrophorétique des ADNc amplifiées SEQ ID N°1 codant pour le canal potassique de *Vitis Vinifera* sur le gel d'électrophorèse, on observe la présence de l'ADNc que dans les parties aériennes et dans les baies pour les plantes PT et les plantes PNT (figure 2). Par contre l'ADNc n'est pas présents dans les racines. La mise en œuvre du procédé de sélection s'effectuera préférentiellement sur toutes les cellules dans lesquelles on a pu détecter le gène d'intérêt.

Etudes physiologiques

Les inventeurs ont découvert que la protéine codée par VvSOR était un canal potassique autorisant un flux d'ions potassiques sortant de la cellule. Ce canal est préférentiellement perméable à l'ion potassium. Ce canal est bloqué par des inhibiteurs similaires à ceux utilisés pour bloquer les canaux potassiques codés par les gènes AtSKOR et AtGORK de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Le canal potassique codé par le gène VvSOR est dépendant de la concentration en potassium externe et interne. Une diminution de la concentration externe de potassium entraîne une diminution du courant potassique sortant. Ce canal est aussi dépendant du pH interne et externe à la cellule. En effet, une diminution du pH externe ou interne entraîne une forte diminution du courant potassique sortant.

**Exemple de mise en œuvre du procédé de sélection de la plante :
détection moléculaire, par mesure de la quantité de protéines produite
ou par la quantité d'ARNm produit.**

Après transformation des cellules de baies de raisins, on broie les cellules de baies de raisins de manière à extraire les ARNm et les protéines aux moments particulièrement propices pour détecter une quantité optimale. Puis on quantifie la quantité d'ARNm VvSOR produit par le gène de *Vitis vinifera* VvSOR par Reverse-PCR quantitative ou hybridation moléculaire (Northern blot), et la quantité de protéines provenant de la traduction de cet ARNm par immunodétection (technique de Western blot). Chacune de ces quantités est comparée à une quantité d'ARNm de référence et à une quantité de protéines de référence qui correspondent respectivement à une quantité d'ARNm et de protéines normalement présentes dans les cellules de plantes non transformées.

On choisit un moment où on a le plus de chance de trouver en grande quantité l'expression du gène à mesurer. Notamment, pour mesurer la quantité d'ARNm, on choisit un moment dans la première phase de croissance C1 de la baie, figure 3. Pour mesurer la quantité de protéine, on choisit un moment d'une des phases de croissance C1 ou C2, préférentiellement C2 ou bien un moment après le développement de la baie.

Références bibliographiques

- Dutruc-Rosset, G. (2003) in: Bull. O.I.V., special issue, pp. 94 O.I.V., Paris.
- 5 - Hrazdina, G., Parsons, G.F. and Mattick, L.R. (1994) American Journal of Enology and Viticulture 35, 220-227.
- Hale, C.R. (1977) Vitis 16, 9-19.
- Véry, A.-A. and Sentenac, H. (2003) Annual Review of Plant Biology 54, 575-603.
- 10 - Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu, C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. (2002) Plant Physiology 128, 564-577.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C. and Delrot, S. (1999) Plant Physiology 120, 1083-1093.
- 15 - Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Cold Spring Harbor:.
- Gaymard, F. et al. (1998) Cell 94, 647-655.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B. (1997) The EMBO Journal 16, 2565-2775.
- 20 - Church, G.W. and Gilbert, W. (1984) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 1991-1995.
- Lacombe, B. and Thibaud, J.-B. (1998) Journal of Membrane Biology 166, 91-100.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000) FEBS Letters 466, 351-354.
- 25 - Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000) The Plant Cell 12, 837-851.
- Zimmermann, S. and Sentenac, H. (1999) Current Opinion in Plant Biology 2, 477-482.
- 30 - Langer, K. et al. (2002) The Plant Journal 32, 997-1009.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. and Hedrich, R. (2000) FEBS Letters 486, 93-98.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. and Sentenac, H. (2003) Journal of Molecular Evolution 56, 418-434.

- Decroocq, V., Fave, M.G., Hagen, L., Bordenave, L. and Decroocq, S. (2003) *Theoretical and Applied Genetics* 106, 912-22.
- Kanellis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1993) in: *Biochemistry of Fruit Ripening*, pp. 189-234 (Seymour, G., Taylor, J. and Tucker, G., Eds.) Chapman Hall, London.
- Winkler, A., Cook, J., Lider, J.A. and Kliever, W.M. (1974) University of California press, Berkeley.
- Blatt, M.R. and Gradmann, D. (1997) *Journal of Membrane Biology* 158, 241-256.
- Roberts, S.K. and Tester, M. (1995) *The Plant Journal* 8, 811-825.
- de Boer, A.H. and Wegner, L.H. (1997) *Journal of Experimental Botany* 48, 441-449.
- Madeja, M. (2000) *News in Physiological Sciences* 15, 15-19.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B. and Hedrich, R. (2002) *The Plant Cell* 14, 1859-68.
- Mouline, K. et al. (2002) *Genes and Development* 16, 339-350.
- Hosy, E. et al. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5549-54.
- Blanke, M.M., Pring, R.J. and Baker, E.A. (1999) *Journal of Plant Physiology* 154, 477-481.
- Possner, D.R.E. and Kliever, W.M. (1985) *Vitis* 24, 229-240.
- Coombe, B.G. (1987) *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 120-127.
- Torregrosa, L. (1998) *Vitis* 37, 91-92.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, W. and Hedrich, R. (2003) *FEBS Lett* (in press).
- Baizabal-Aguirre, V.M., Clemens, S., Uozumi, N. and Schroeder, J.I. (1999) *Journal of Membrane Biology* 167, 119-125.

REVENDEICATIONS

1 - Procédé pour l'obtention d'une plante transformée en fonction d'un phénotype relatif à une taille d'un organe de stockage de la plante, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :

- modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou dans les tissus qui alimentent l'organe de stockage l'expression d'un gène codant pour un canal potassique.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
- on transforme au moins une cellule de la plante par le gène codant pour un canal potassique,
- on sélectionne la cellule transformée, et
- on régénère une plante transformée à partir de la cellule transformée.

3 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que le gène dont l'expression est modifiée code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.

4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on surexprime le gène afin d'augmenter la taille de l'organe de stockage.

5 - Cellule transformée, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 4.

6 - Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 5.

7 - Marqueur d'un gène intervenant dans un phénotype relatif à une taille d'un organe de stockage, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie d'une séquence nucléotidique SEQ ID N°.1 ou de tout ou partie d'une séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°.1, ou d'une séquence nucléotidique SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.

8 - Utilisation du marqueur selon la revendication 7 pour sélectionner des plantes ou des cellules surexprimant un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

9 - Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de l'une ou l'autre séquence nucléotidique SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.

10 - Utilisation de l'amorce selon la revendication 9 pour sélectionner des plantes ou des cellules surexprimant un gène codant une séquence polypeptidique contenant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de l'une ou l'autre séquence nucléotidique SEQ ID N°.1, SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.

11 - Procédé de sélection d'une plante en fonction d'un phénotype relatif à une taille des organes de stockages de ladite plante, caractérisé en ce qu'on mesure l'expression d'un gène codant pour un canal potassique dans les cellules des organes de stockage ou dans les tissus qui alimentent les organes de stockage.

12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le gène dont on mesure l'expression code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.

13 - Procédé selon l'une des revendications 11 à 12, caractérisé en ce que

- on mesure une quantité d'ARNm issu d'une transcription du gène, ou
- on mesure une quantité de protéines résultant de l'expression du gène.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la mesure de la quantité d'ARNm est faite au cours d'un développement des organes de stockage et en ce que la mesure des protéines est réalisée pendant ou après le développement des organes de stockage.

15 - Cellule d'une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.

16 - Plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

17 - Utilisation d'un gène codant un canal potassique pour modifier dans une plante un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage.

5 18 - Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

19 - Utilisation selon l'une des revendications 17 à 18, caractérisée en ce que

10 - on surexprime le gène dans des cellules de l'organe de stockage.

20 - Anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant un canal potassique.

15 21 - Anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

22 - Procédé de détection d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique dans un échantillon comportant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 - mettre en contact l'échantillon avec un anticorps selon l'une des revendications 20 à 21, et

- détecter un complexe antigène/anticorps formé.

25 23 - Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1.

24 - Kit de détection de tout ou partie d'un polypeptide produit d'un gène codant un canal potassique dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend

- un anticorps selon l'une des revendications 20 à 21.

30 25 - Kit de détection selon la revendication 24, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°.1

Figure 1

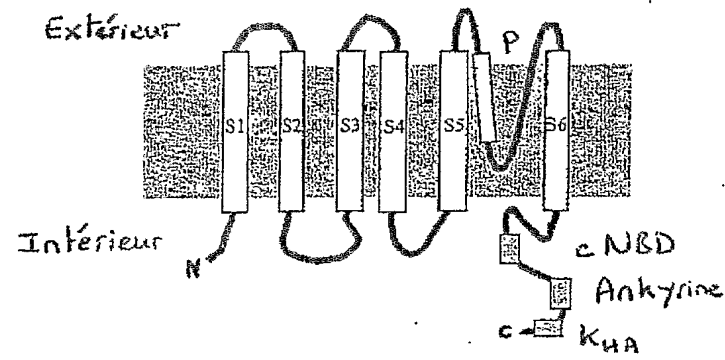


Figure 2

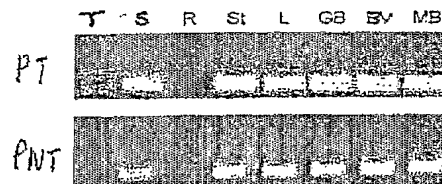


Figure 3

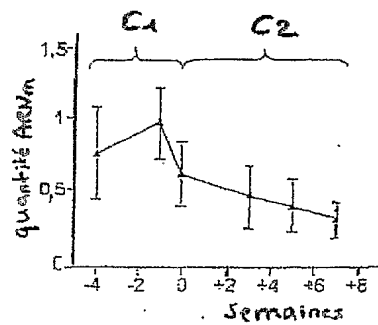


Fig. 1

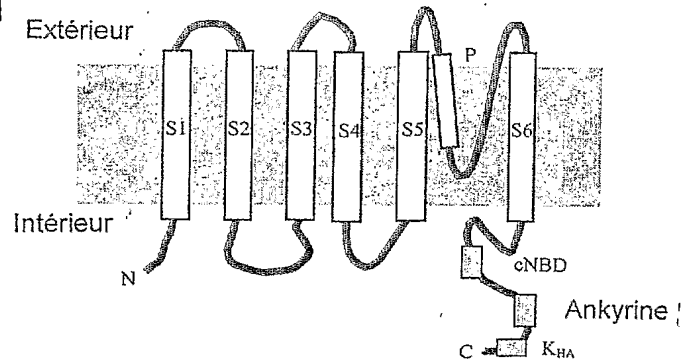


Fig. 2

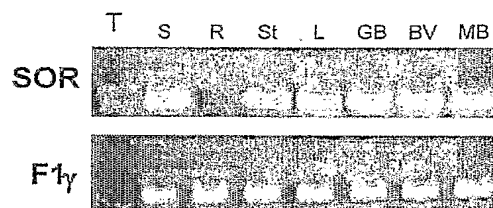


Fig. 3

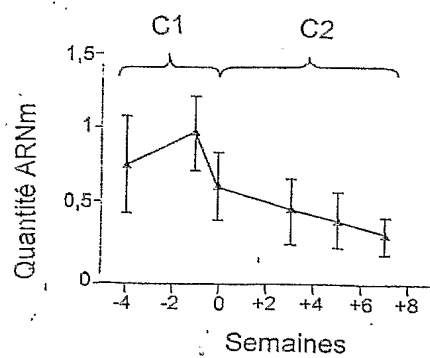


Figure 4

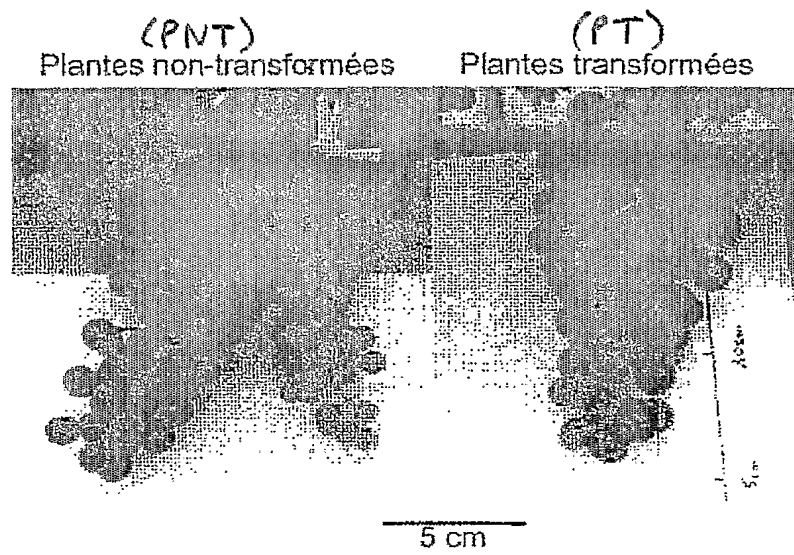
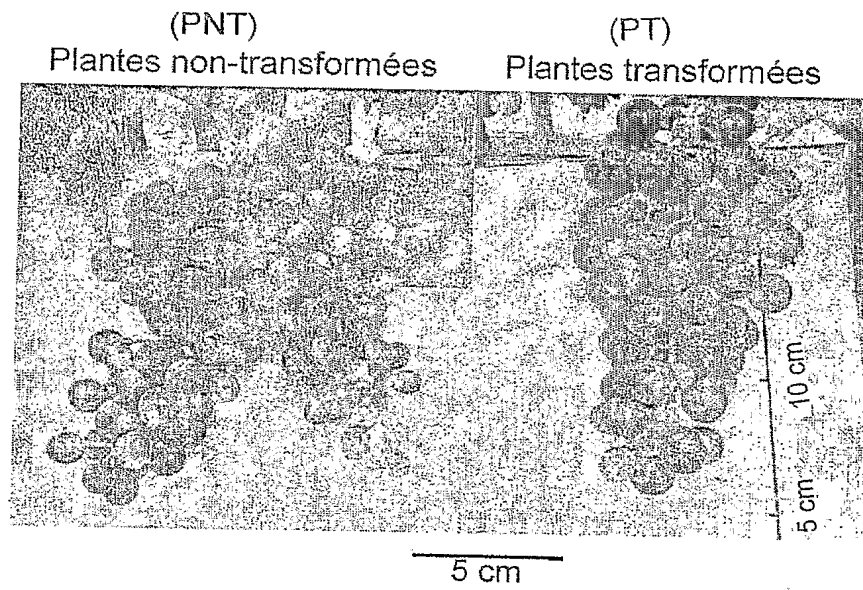


Fig. 4



Listing sequence

<110> : Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.)
 <120> : Utilisation de gènes codant pour des canaux potassiques pour modifier la
 taille des fruits
 <130> :
 <140> : FR03XXXX
 <141> :
 <170> : PatentIn version 3.1
 <212> : DNA/RNA
 <211> : 2376
 Nom de la séquence : SEQ ID N°1 ou VvSOR
 <213> : Vitis vinifera
 <400> : 1

```

atgtcgtttt cttgtgcaaa agccttcttc caacggtttt gtgttgaaga gttccaaatg      60
gagagaacta gcctaggttc cgtcttctct agtcatctcc tcccatctct tggggccaga      120
atcaaacagg caacaaagct tcaaaaacac ataatttctc ctttcagtc cggttacagg      180
gcttgggaaa tggttgctgat tattctggtc atctactctg cctggatctg cccatttgag      240
tttggatttc tgccctacaa gcaagacgcg cttttcatct tcgataacat tgtcaatggc      300
ttcttcgcca tcgatatcgt tctcactttc tttgtagcat acctcgacac agaaacttat      360
cttcttggtt atgatgccaa gaaaattgca atcaggtaca tatctacctg gtttatcttc      420
gatgtctgtt cgacagcgcc atttgaagct ttcagcctcc tgttcacaaa gcataacagt      480
ggactcggct ataaagcact caacatgctc aggctctggc gactgagacg agtcagctcc      540
ctgtttgcaa gactagagaa ggacatccgg ttttaactact tctggattcg atgcataaaa      600
ctcacttctg taactctgtt tgcagtacac tgtgctggat gctttaacta tctgattgca      660
gatatatacc cggatccaga acgaacctgg attggtgcag tctatccaaa tttcaaagaa      720
gagaacctct gggacagata tgtaacttca atttactggg ctattactac actaactact      780
actggttatg gagacttgca tgcagagaac ccaagagaga tgctgtttga tattttttac      840
atgctattca acttgggatt aacatcttac ctcatgggga acatgacca tcttgttggt      900
cactggacca gccggaccag agatttttagg gatacagtca ggtctgcttc agagtttgca      960
acaaggaatc aattgcccc acgcattcag gatcagatgc tgtcgcactt atgtctcaag     1020
ttcaaacacg aaggattgaa acaacaagac actttgaatg gcctgccaa agccattcgc     1080
tccagcattg cactactact cttcttccct atcgtcmeta atgtctatct tttccagggt     1140
gtttctcagg acttcccttt ccaactgggt tctgaagtgg aggctgagta tttcccacct     1200
agagaagatg tgattctaca gaaggaggct tcaacagata tatatattct tgtctcggga     1260
gcggtggatt tgatagcata tattgacgga catgatcaga ttctcggaaa ggctggttga     1320
ggggatgtgt ttggagagat tgggggtttta tggtataggc cacaatcggt aacagtcagg     1380
acctctgagc tttctcagat actaagatta agcagaactt cactgatgaa cgcaatccaa     1440
gcaaatatgg aagatggacc aattattatg aaccatcttt tcaagaaact gaaagggcta     1500
gaaagctcag gctttacaga cccacatatg gaccagatt ccatcctcag agaatggatt     1560
gatggagtag caccaggagg aagccttttc catgctggat gtcagatgca atcaccacat     1620
ggagatccaa caatacaaga agcaaggagc atagggtttac tgggatcaga agctacaaag     1680
aagagttaaag cagacaaagc tcatgagtcg actggatgcg ggatcgatgc aaattcagca     1740
gctgaggatg gccaaaacggc tcttcatggt gctgtctgca acgggcatct tgaaatgggt     1800
agaattctgc tagaaagagg agcaaagtgt aacaaaaagg atgctagagg gtggacccca     1860
aaagcttttag cggaaacaaga aggaaaaaaa agcatatatg acctcttact aagttatgaa     1920
aatagaaggt tattagatga acacaaaatt cattttattg ggtcagacgc agctgactgt     1980
tgtactagtc aagggtctaca tacaagaacg gggggggcca attttcacaa ctctcaatth     2040
aaaaagggtat ccacaaattc caattcaggc agtcctagcc ctcccggcaa caaagatggt     2100
atgacattga ccaagaggag agtcactatc cacagacagt ttcaaaatgc aagtacatca     2160
caggggcagc ttgggaagtt gattattcta cctgattcaa tagaagagct actgcaaatt     2220
gctgggtcaa agtttggagg ctacaatccc accaaagtcg ttagtgcagg gaatgcagaa     2280
atagatgaca taagcgttat ccgagatggg gatcatctgt ttctacttca aaatgagaat     2340
ggaactacaa ttacaatggt acctaaggtt tactga      2376
  
```

<212> : RNA
 <211> : 28
 Nom de la séquence : amorce spécifique avant ou SEQ ID N°2
 <213> : Vitis Vinifera
 <400> : 2

gcaaagttgc ttttaggaaa gccggggc

28

<212> : RNA

<211> : 27

Nom de la séquence : amorce spécifique arrière ou SEQ ID N°3

<213> : Vitis Vinefera

<400> : 3

ttcacataac aaatatagct tctgacc

27



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 3..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		11302 FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0450199	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE GENES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES POUR MODIFIER UN PHENOTYPE RELATIF A UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147 rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PRATELLI	
Prénoms		Réjane	
Adresse	Rue	Lotissement de Viaiguemaux	
	Code postal et ville	73350	BOZEL
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		HOSY	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	7 allée de la Sorgues	
	Code postal et ville	13140	MIRAMAS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LACOMBE	
Prénoms		Benoît	
Adresse	Rue	2420 avenue de Toulouse	
	Code postal et ville	34070	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) 10 février 2004 Christian SCHMIT Mandataire			



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
 Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
 75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 3.
 (Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		11302 FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0450199	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE GENES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES POUR MODIFIER UN PHENOTYPE RELATIF A UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147 rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ROMIEU	
Prénoms		Charles	
Adresse	Rue	8 rue de la Grimaudière	
	Code postal et ville	34830	JACOU
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		TORREGROSA	
Prénoms		Laurent	
Adresse	Rue	15 cité de l'Enclos	
	Code postal et ville	11200	LUC/ORBIEU
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		THIBAUD	
Prénoms		Jean-Baptiste	
Adresse	Rue	10 rue du Général Maureilhan	
	Code postal et ville	34000	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) 10 février 2004 Christian SCHMIT Mandataire			



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3.. / 3..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		11302 FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0450199	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE GENES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES POUR MODIFIER UN PHENOTYPE RELATIF A UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147 rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SENTENAC	
Prénoms		Hervé	
Adresse	Rue	51 rue Michel-Ange Les Ormeaux Bat N	
	Code postal et ville	34070	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) 10 février 2004 Christian SCHMIT Mandataire			

PCT/FR2005/050060

